مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۸ شماره ۳ صفحه های ۱۶۵ تا ۱۷۴ (۱۳۸۶)

گندزدایی، استقرار و پرآوری درکشت درون شیشه ای چند دو رگه بین گونه ای در جنس پرونوس[1]

STERILIZATION, ESTABLISHMENT AND PROLIFERATION OF SOME *PRUNUS* INTERSPESIFIC HYBRIDS FOR *IN VITRO* CULTURE

جلیل دژمپور، وازگین گریگوریان، اسلام مجیدی و ناصر علی اصغرزاده[2]

چکیده

دراین پژوهش، گندزدایی و گزینش مناسب ترین محیط کشت به همراه تناسب هورمونی در کشت درون شیشه ای برای چهار دورگه بین گونه ای در جنس پرونوس بررسی شد. مواد گیاهی از دورگه های HS314 (هلو × بادام)، HS302 (گوجه × زردآلو)، HS721 (گوجه × بادام) و HS408 (آلو × زردآلو) که در ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند به دست آمده اند به همراه دورگه GF677 (به عنوان شاهد) به صورت شاخه های تک جوانه در فصل رویشی و خفتگی برداشت شدند. ریزنمونه ها پس از شستشوی سطحی با غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه گندزدایی شده و سپس در محیط های کشت MS تغییر یافته، WPM، Knop تغییر یافته و QL کشت شدند. نتایج نشان داد که هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه با غلظت های ۰/۵، ۰/۸ و ۱ گرم در لیتر به مدت ۵ دقیقه به ترتیب برای نمونه های علفی، نیمه چوبی و چوبی کمترین آلودگی را دارند. درمرحله استقرار، محیط کشت WPM برای HS302 و HS408 با BAP (۰/۵ میلی گرم در لیتر) وNAA (۰/۰۵ میلی گرم در لیتر) و برای HS314 و HS721 محیط MS تغییر یافته با همان میزان هورمون با بیشترین درصد رشد، استقرار موفق تری داشتند. در مرحله پرآوری MS تغییر یافته و MS نیم غلظت برای HS314 , HS721 وGF677 و WPM برایHS302 و HS408 با BAP (۱ میلی گرم در لیتر) به همراه IBA (۰/۰۱ میلی گرم در لیتر) بهترین محیط کشت بودند. بنابراین نژادگان های HS۳۱٤ وHS ۳۰۲ بیشترین توانایی استقرار و شاخه زایی را داشتند و نژادگان های HS۷۲۱ و HS ٤۰۸ از کمترین میزان رشد و شاخه زایی بر خوردار بودند.

واژه های کلیدی : استقرار، پرآوری، دورگه های بین گونه ای، گندزدایی، محیط کشت.

مقدمه

ریزافزایی یکی از روش های نوین افزایش انبوه گیاهان به ویژه پایه های درختان میوه در چند دهه اخیر می‌باشد. تولید پایه های رویشی و یکسان از نیازهای اولیه احداث باغ های مدرن و صنعتی امروزه به شمار

۱- تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۸٦/۸/۲

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری دانشگاه تبریز و عضو هئیت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان شرقی، تبریز، استاد علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج و دانشیار گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، جمهوری اسلامی ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

می رود، به طوری که مدیریت صحیح باغ، افزایش عملکرد در واحد سطح، داشت و برداشت ماشینی باغ ها و در پایان داشتن پایه های مقاوم به تناسب شرایط اقلیمی و محیطی همگی نیازمند وجود پایه های پاکوتاه و رویشی خواهد بود (۱، ۳). استفاده از دورگه های بین گونه ای به ویژه برای درختان میوه هسته دار از چند دهه پیش در کشورهای پیشرفته معمول شده واین رویکرد راهگشای بسیاری از مشکلات درختان میوه هسته دار شده است (۳، ۷).

تاباکنیک و کستر[۱] (۱۱) پایه های رویشی هلو × بادام به نام های هانسن ۲۱۶۸ و هانسن ۵۳۶ از کالیفرنیا را به روش ریزافزایی افزایش انبوه نمودند و بهترین نتیجه را از محیط کشت تاباکنیک و کستر (TK) (۲۰) به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزین آمینومیورین[۲] (BAP) به دست آوردند. این پژوهشگران همچنین گزارش نمودند که سایتوکینین برای مرحله استقرار و افزایش و پرآوری ضروری است و جیبرلیک اسید[۳] (GA3) برای رشد شاخساره ها پیش از مرحله ریشه زایی را بسیار موثر دانستند. در ایران اولین پژوهش در مورد افزایش درون شیشه ای دورگه هلو × بادام (GF ۶۷۷) توسط کمالی و همکاران (۴) در سال ۱۳۸۰ اجرا شد. این پژوهشگران گزارش کردند که بهترین روش گندزدایی استفاده از کلریدجیوه ۰/۱٪ به مدت ۶ دقیقه می‌باشد و بیشترین شاخه زایی با استفاده از محیط کشت Knop تغییر یافته (۴) به همراه ۲٪ سوکروز و یک میلی گرم در لیتر BAP بدون افزودن نفتالن استیک اسید[۴] گیاهان چوبی (NAA) به دست آمد. ذوالفقار نسب وهمکاران (۲) گزارش کردند که از بین محیط های کشت بررسی شده MS[۵] (۱۵)، (WPM)[۶] (۱۴) و M1 (۲)، محیط کشت WPM با یک میلی گرم در لیتر BAP بالاترین نسبت پرآوری و با ۶/۵ میلی گرم در لیتر IBA ایندول بوتیریک اسید[۷] بالاترین درصد ریشه زایی را در ریزافزایی درون شیشه ای دورگه گوجه × زردآلو داشتند. میری وهمکاران (۵) برای جلوگیری از قهوه ای شدن نمونه های گیاهی در کشت درون شیشه ای همگروه های سیب M.26 و M.9 ، نگهداری ریزنمونه های تازه کشت شده به مدت ۶ روز در یخچال را توصیه کردند. در بهنژادی پایه های درختان میوه یکی از مهمترین ویژگی هایی که در گزینش پایه مد نظر می باشد داشتن توانایی افزایش رویشی آسان می باشد (۱۳،۱۰). در این میان ریزافزایی به عنوان یکی از روش های کشت درون شیشه ای مناسب ترین روش برای افزایش انبوه و تجاری پایه های درختان میوه شناخته شده است (۳، ۹). بنابراین هدف از این پژوهش تعیین بهترین روش گندزدایی، ارزیابی توانایی افزایش درون شیشه ای وگزینش مناسب ترین محیط کشت با نسبت هورمونی مناسب برای ریزافزایی دورگه ها است.

مواد و روش ها

در این آزمایش توانایی ریزافزایی چهار دورگه بین گونه ای پرونوس[۸] مورد بررسی قرار گرفت. این دورگه ها از سال ۱۳۷۷ در ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند واقع در ۳۵ کیلومتری جنوب غربی شهر تبریز وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی تحت بررسی بوده و بررسی های اولیه آن ها شامل ویژگی های رویشی و زایشی، مقاومت های نسبی آن ها به تنش های محیطی، آفات و بیماری ها و امکان افزایش آن ها از راه قلمه و خواباندن به روش های مختلف روی آن ها انجام گرفته و نژادگان های

۱- Tabachnick and Kester ۲- Benzylamino purine ۳- Gibberellic acid ۴- Naphthaleneacetic acid
۵- Murashige and Skoog ۶- Woody Plant Medium ۷- Indolebutyric acid ۸- *Prunus*

Archive of SID

www.SID.ir

امیدبخش گزینش شده اند. دورگه های تحت بررسی از میان ۱۰۶ دورگه موجود در ایستگاه سهند گزینش شده وشامل نژادگان HS۳۱۴ به عنوان دورگه هلو × بادام (*P. amygdalus* × *P. persica*)، HS۳۰۲ دورگه گوجه × زردآلو (*P. armeniaca* × *P. cerasifera*)، HS ۴۰۸ دورگه زردآلو × آلو (*P. armeniaca* ×*P. domestica*) و HS۷۲۱ دورگه گوجه × بادام (*P. amygdalus* × *P. cerasifera*) می باشند که به همراه GF ۶۷۷ (*P. amygdalus* × *P. persic*) به عنوان شاهد با دیگر پایه های رویشی مورد نظر دراین آزمایش مقایسه شد. این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب کشور در سال های ۱۳۸۴و۱۳۸۵ اجرا شد. نمونه های گیاهی به صورت شاخه های رشد فصل جاری (علفی، نیمه چوبی و چوبی) از ایستگاه تهیه و سپس به صورت قلمه های دو یا سه جوانه ای برای گندزدایی آماده شدند. این پژوهش در قالب سه آزمایش جداگانه به شرح زیر اجرا شد.

آزمایش اول – گندزدایی مواد گیاهی

ابتدا تمامی نمونه ها با آب و مایع ظرفشویی شستشوی سطحی شده سپس توسط اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ تا ۵۰ ثانیه گندزدایی سطحی (این بخش از گندزدایی در طول آزمایش ثابت بوده است) و پس از آن با هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ در سه زمان (به مدت ۵، ۷ و ۱۰دقیقه) تیمار شدند. به دلیل حساسیت بیشتر بافت های گیاهی به کلرید جیوه و نقش کلیدی آن در گندزدایی مواد گیاهی از ۳ غلظت مختلف (۰/۵، ۰/۸ و۱ گرم در لیتر) به مدت ۵ دقیقه برای تعیین مناسب ترین غلظت آن استفاده شد. لازم به ذکر است پس از هریک از مراحل یاد شده نمونه ها با آب مقطر گندزدایی شده چند مرتبه آبکشی شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح به طور کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد که هر تکرار شامل ۲۰ نمونه تک جوانه بود و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن انجام گر فت.

آزمایش دوم – مرحله استقرار

در این مرحله چهار دورگه بین گونه ای به همراه GF ۶۷۷ (دورگه هلو× بادام) به عنوان شاهد در چهار محیط کشت شامل: QL[۱] (۱۷)، WPM، MS تغییر یافته و Knop تغییر یافته و با استفاده از تنظیم کننده های رشد BAP (صفر، ۰/ ۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰/۰۵ میلی گرم در لیتر) کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل که در آن فاکتور اول نژادگان (در ۴ سطح)، فاکتور دوم محیط کشت (در ۴ سطح) و فاکتور سوم غلظت تنظیم کننده رشد (در ۳ سطح) بود درقالب طرح پایه به طور کامل تصادفی با ۳ تکرار که در هر تکرار ۱۰ لوله آزمایش در نظر گرفته شده بود، اجرا شد. شایان ذکر است که pH محیط کشت ها روی ۵/۷ تنظیم شد و در تهیه آن ها از آگار ۰/۷٪ و سوکروز ۳٪ استفاده شد. زیرکشت[۲] نمونه ها به فواصل زمانی ۲۰ روزه انجام گرفت و ظروف کشت مورد استفاده در این مرحله از آزمایش لوله های شیشه ای ۲۵×۱۵۰ میلی متری بودند.

آزمایش سوم – مرحله پرآوری

در این مرحله نمونه هایی که رشد کافی داشتند به محیط کشت پرآوری و شاخه زایی منتقل شدند. محیط کشت های مورد استفاده برای این مرحله MS تغییر یافته، WPM و MS با نیم غلظت به همراه ۴ غلظتBAP

۱- Quoirin and Lepoivre ۲- Subculture

Archive of SID

www.SID.ir

(صفر،۰/۵،۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) و IBA (۰/۱ میلی گرم در لیتر) بود. طرح آزمایشی و شرایط محیط کشت همانند مرحله استقرار بود. در این مرحله بیشتر از ظروف شیشه ای بزرگتر (۱۰۰میلی لیتری) استفاده شد. تعداد شاخساره های تولید شده با طول بیش از ۰/۵ سانتی متر در ارزیابی میزان پرآوری استفاده شد. در زیرکشت های پایانی مرحله پرآوری، برای ایجاد رشد طولی شاخساره ها وآماده شدن نمونه ها برای انتقال به محیط ریشه زایی از GA_3 به مقدار ۲ میلی گرم درلیتر استفاده شد. شرایط اتاق کشت شامل دمای ۲٤ درجه سانتی گراد، رطوبت ٦۰٪، فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و شدت نور ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس بود.

نتایج

مرحله گندزدایی

نتایج نشان داد که گندزدایی نمونه های علفی با هیپو کلریت سدیم ۲/۵٪ برای مدت ۵ دقیقه، برای نمونه های نیمه چوبی ۷ دقیقه و برای نمونه های چوبی ۱۰ دقیقه بیشترین درصد نمونه های سالم را دارا بود ولی در مورد نمونه های علفی و چوبی از نظر آماری با تیمار ۷ دقیقه اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ دیده نشد (جدول ۱). مناسب ترین غلظت کلرید جیوه برای گندزدایی نمونه های علفی ۰/۵ گرم در لیتر، برای نمونه های نیمه چوبی ۰/۸ گرم در لیتر و برای نمونه های چوبی ۱ گرم در لیتر به ترتیب با ۸۰،۸۰ و ۸۵٪ نمونه سالم بود (جدول ۱). بایستی به این نکته اشاره نمود که انجام گندزدایی های اولیه با اتانول ۷۰٪ و آبکشی نمونه ها با آب مقطر گندزدایی شده در هریک از مراحل به عنوان پیش تیمار های اولیه این آزمایش ضروری بوده و اجرا شد.

آنچه که در طول مراحل گندزدایی تجربه شد واکنش متفاوت نژادگان ها به مواد گندزدایی کننده است به طوری که نژادگان های HSv۲۱ وHS۳۰۲ نسبت به کلرید جیوه حساس تر از سایر نژادگان ها بودند و زمانی که غلظت کلرید جیوه به بیش از یک گرم در لیتر می رسید و یا مدت زمان تیمار طولانی می شد موجب از بین رفتن بافت های سطحی پوست و قهوه ای شدن نمونه ها شده ودر پایان موجب کاهش درصد نمونه های رشد کرده شد.

مرحله استقرار

شکل ۱ استقرار ریز نمونه ها را نشان می دهد. نتایج نشان داد در این مرحله اثر برهمکنش محیط کشت × نژادگان و محیط کشت × نژادگان × هورمون، معنی دار بود. به طوری که برای نژادگان های HS۳۰۲ و HSv۲۱ بهترین محیط کشت WPM و برای نژادگان های HS۳۱۴ و HS۴۰۸ مناسب ترین محیط کشت MS تغییر یافته بود. این موضوع نشان دهنده این است که هریک از نژادگان ها بسته به نوع محیط کشت و غلظت های مختلف تنظیم کننده رشد BAP از درجه رشد متفاوتی برخوردار هستند (جدول ۲). دورگه های تحت مطالعه در هیچ یک از محیط کشت های Knop تغییر یافته و QL رشد خوبی نداشتند. دراین مرحله با وجود این که ریزقلمه ها با تیمار هورمونی BAP (۰/۵ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰/۰۵ میلی گرم در لیتر) رشد خوبی داشتند ولی با سایر تیمار های تنظیم کننده رشد اختلاف معنی داری نشان ندادند (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

مرحله پرآوری

برهمکنش (نژادگان × محیط کشت، نژادگان × تنظیم کننده رشد و نژادگان × تنظیم کننده رشد × محیط کشت) و اثرهای ساده در این بخش از آزمایش معنی دار بود و این نشان دهنده آنست که نژادگان ها نسبت به محیط کشت ها و غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد واکنش متفاوتی نشان دادند و درجه پرآوری هریک از نژادگان ها با همدیگر فرق می کند.

جدول ۱- تاثیر مدت زمان تیمار با هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ و غلظت های مختلف کلرید جیوه (به مدت ۵ دقیقه) در گندزدایی نمونه های تک جوانه در مراحل مختلف فنولوژیکی.

Table 1. Effects of different times of treatment with ClONa 2.5% and concentrations of $HgCl_2$ (5 min) on sterilization of single–node explants in different phenological stages.

غلظت کلرید جیوه Concentration of $HgCl_2$		0.5 g^{-1}			0.8 g^{-1}			1 g^{-1}		
هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ (دقیقه) ClONa 2.5% (min)		5	7	10	5	7	10	5	7	10
علفی (درصد نمونه سالم) Herbaceous (% of healthy explants)	80b†	75bc	70.4d	30g	28gh	25.2h	10.2i	9i	5j	
نیمه چوبی (درصد نمونه سالم) Semi-hardwood (% of healthy explants)	26.6h	30g	29g	72cd	80b	73cd	54.5e	50ef	42f	
چوبی (درصد نمونه سالم) Hardwood (% of healthy explants)	2j	2.2j	3j	64de	65de	70.4d	80b	82ab	85a	

† Means with the same letters are not significantly different at 5% level probability using DMRT.

† میانگین های با حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن ندارند.

Fig. 1. Establishment and growth of single-node explants.

شکل ۱- استقرار و رشد نمونه های تک جوانه.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- اثر محیط های کشت و سه غلظت بنزیل امینو پیورین (میلی گرم در لیتر) در استقرار ریزنمونه های تک جوانه ای در چند دورگه بین گونه ای جنس پرونوس.

Table 2- Effect of different media and BAP (mg l^{-1}) concentrations on establishment of single–node explants of some interspesific hybrids of *Prunus*.

	محیط های کشت Media culture											
	MS تغییر یافته Modified MS			WPM			QL			Knop		
Concentration → غلظت BAP ↓												
نژادگان Genotype	0	0.5	1	0	0.5	1	0	0.5	1	0	0.5	1
HS314	68.2b	70.3b	70.1b	58.5c	61.2bc	59.3c	35.3f	43.0de	32.5fg	28.9h	32.5fg	33.8fg
HS302	61.5bc	64.8bc	64.5bc	74.2a	75.0a	72.6ab	50.7cd	54.9d	55.0cd	33.2fg	35.5f	35.0f
HS408	42.7dc	45.0d	43.0de	35.3f	36.4ef	31.4g	28.0h	30.1g	30.5g	26.4hi	28.0h	30.3g
HS721	26.0hi	30.6g	30.5g	41.6e	40.8e	25.9hi	24.2hi	25.0i	23.6i	25.0hi	25.2hi	32.8i
GF677	61.3bc	61.5bc	60.9bc	55.0cd	58.0 c	57.0c	39.4e	40.0e	38.1ef	29.4gh	30.3g	30.1g

† Means with the same letters are not significantly different at 5% level probability using DMRT.

† میانگین های با حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن ندارند.

دورگه های۳۰۲ HS و HS۴۰۸ در محیط کشت WPM به ترتیب با میانگین پرآوری ۵/۷ و ۲/۴ شاخساره و نژادگان های HS۳۱۴ ,HS۷۲۱ و GF۶۷۷ درمحیط کشت MS تغییر یافته به ترتیب با میانگین پرآوری ۴/۸، ۱/۷ و ۳/۹ شاخساره با غلظت ۱ میلی گرم درلیترBAP + ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA بیشترین شاخه زایی را داشتند ولی با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP اختلاف در میزان شاخه زایی نژادگان ها معنی دار نبود (جدول ۳). شکل ۲ شاخساره های رشد کرده دورگه های بین گونه ای در محیط استقرار و پرآوری را نشان می‌دهد.

آلودگی درونی[۱] در این مرحله نیز وجود داشت ولی درصد آن در مقایسه با مرحله استقرارکمتر (۲۰-۳۰٪) بود، با این حال نمونه هایی که زودهنگام (۷-۱۰ روزه) زیرکشت می شدند (از بخش های انتهایی و سالم شاخساره ها) موجب کاهش درصد آلودگی در مراحل بعدی می شدند و که گاهی به صفر می رسید ، در غیر این صورت به تدریج با زردی[۲] و قهوه ای[۳] شدن برگ ها و در پایان با ایجاد اختلال در جذب عناصر غذایی و مواد تنظیم کننده رشد مرگ گیاهک ها رخ می داد.

۱- Internal contamination ۲- Chlorosis ۳- Necrosis

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ – میزان پرآوری و شاخه زایی (تعداد شاخساره) چند دورگه بین گونه ای جنس پرونـوس در سه محیط کشت مختلف با غلظت های مختلف BAP برحسب میلی گرم در لیتر.

Table 3. Effects of different concentrations of BAP (mg l^{-1}) in 3 culture media on shoot proliferation of some interspecific hybrids of *Prunus.*

BAP concentration غلظت BAP نژادگان / Genotype	Media culture محیط های کشت											
	Modified MS تغییر یافته MS				WPM				MS 1/2			
	0	0.5	1	1.5	0	0.5	1	1.5	0	0.5	1	1.5
HS314	0.8jk†	3.5de	4.8ab	4.7ab	0.8jk	3.5de	4.6ab	4.6ab	0.7jk	4bc	4.3bc	4.4bc
HS302	0.75jk	2.7ef	4bc	4bc	1ij	3.8cd	5.7a	5a	0.5kl	2.5efg	3ef	2.8ef
HS408	0.25kl	1.2hi	1.4hi	1.3hi	0.4kl	1.5ghi	2.4efg	2.2fg	0kl	0.8jk	0.9ij	1ij
HS721	0.12l	1ij	1.7gh	1.6gh	0.1kl	0.9ij	1.7gh	1.7gh	0.1	0.7jk	1.3hi	1ij
GF677	1ij	2.8ef	3.9cd	3.9cd	0.9hi	2.6efg	3.8cd	3.7cd	0.6kl	3ef	3.7cd	3.6de

† Means with the same letters are not significantly different at 5% level of probability using DMRT.

† میانگین های با حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ با استفاده آزمون دانکن ندارند.

Fig. 2. Shoots of interspecific hybrids grown on establishment and proliferation media.

شکل ۲ – شاخساره های رشد کرده دورگه های بین گونه ای در محیط استقرار و پرآوری.

حساسیت نمونه ها به نوع محیط کشت در این مرحله بیشتر بود به طوری کـه درمحـیط MS اسـتاندارد هیچ یک از نژادگان ها نتیجه مطلوبی نداد. در محیط WPM وMS تغییر یافته وMS با نیم غلظت میانگین درصـد موفقیت ۶۰–۵۰ ٪ بود که در زیرکشت های بعدی به ۸۰–۷۰ ٪ رسید. در میان نژادگان هـا ی تحـت بررسـی ۳۱۴

Archive of SID

www.SID.ir

HS و HS۳۰۲ در مقایسه با سایرین از رشد و توانایی شاخه زایی بسیار خوبی برخوردار بودند و این اختلاف معنی دار بود (شکل ۳). استفاده از NaH_2PO_4 به میزان ۱۲۸ میلی گرم در لیتر در مرحله پرآوری موثر واقع نشد با اینکه از این ماده شیمیایی در منابع مختلف به عنوان رونق بخش مرحله پرآوری ذکر می شود (۹).

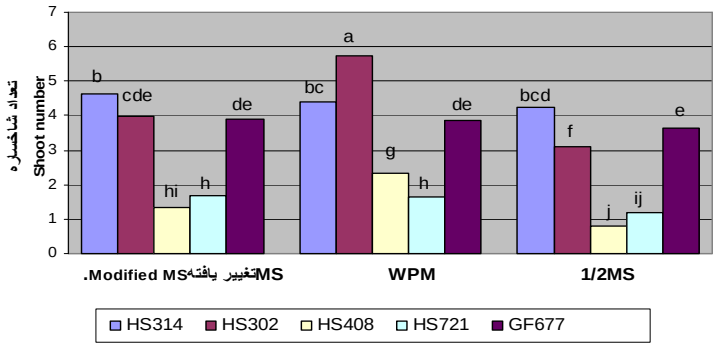

Fig. 3. Comparison of mean proliferation of some *Prunus* interspecific hybrids in three culture media (1mg l^{-1} BAP + 0.05 mg l^{-1} IBA). Means with the same letters are not significantly different at 5% level of probability using DMRT.

شکل ۳- مقایسه میانگین میزان پرآوری چند دورگه بین گونه ای پرونوس در سه محیط کشت مختلف با تنظیم کننده رشد ۱ میلی گرم درلیتر BAP + ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر IBA. میانگین های با حروف مشابه اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن ندارند.

بحث

در این پژوهش دورگ های HS ۳۱۴ و HS ۳۰۲ از نظر ژنتیکی در مقایسه با سایر نژادگان ها توانایی بیشتری برای افزایش درون شیشه ای از خود نشان دادند، به طوری که حتی از دورگه GF۶۷۷ نیز بهتر بودند ولی دورگه های HS۴۰۸ (آلو × زردآلو) و HS۷۲۱ (گوجه × بادام) در هیچ یک از محیط ها و تیمار های مورد استفاده نتیجه مطلوبی ندادند. در مرحله استقرار بین نژادگان ها از نظر درصد ریز نمونه های رشد کرده اختلاف معنی داری وجود داشت و نژادگان های HS۳۱۴، HS۳۰۲ به ترتیب با ۷۰ و۷۵٪ رشد، استقرار موفق تری از HS۴۰۸ و HS۷۲۱ داشتند. با این که رشد ریز قلمه ها در غلظت های مختلف تنظیم کننده رشد BAP تفاوت معنی داری نداشتند با این حال این اختلاف در مرحله علفی بیشتر از مرحله نیمه چوبی و چوبی بود، به بیان دیگر افزودن تنظیم کننده رشد BAP به مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر همراه با ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA در مرحله علفی رشد ریز نمونه ها را بیشتر رونق می بخشد و این موضوع شاید مربوط به تفاوت در ذخایر مواد کربوهیدراتی و هورمونی ریز نمونه ها باشد.

برای نژادگان HS۳۱۴ و GF۶۷۷ در مرحله استقرار و پرآوری محیط MS تغییر یافته مناسب ترین محیط بود در حالی که برای HS۳۰۲ محیط WPM بهترین نتیجه را داد. این در حالی است که برای دورگه گوجه × زردآلو ذوالفقار نسب و همکاران (۲) بهترین نتیجه را در مرحله شاخه زایی از محیط WPM گرفتند و تاباکنیک و کستر (۱۲،۱۱) برای دورگه های هلو × بادام "هانسن ۲۱۶۸ " و "هانسن۵۳۶ " از کالیفرنیا بهترین محیط کشت را TK با BAP ۰/۱ میلی گرم در لیتر معرفی نمودند. این نتایج همگی موید واکنش متفاوت نژادگان ها به

Archive of SID

www.SID.ir

محیط های کشت، تنظیم کننده های رشد و شرایط کشت می باشد، به طوری کـه چاننونتـا پیپـات و همکـاران[1] (۸) نیز ریزافزایی دو رقم بادام 'نن پاریل' و 'نوپلوس اولتـرا' و یـک دورگـه گزینشـی هلـو × بـادام ('نماگـارد' × 'تیتان') را از نظر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم کننده های رشد بررسـی کـرده و گـزارش نمودنـد کـه بهتـرین محیط کشت برای پرآوری رقم 'نن پاریل' محیط AP بـه همـراه BAP (۰/۶۷میلـی گـرم در لیتـر) و IBA (۰/۰۱ میلی گرم در لیتر) می باشد و برای رقم 'نوپلوس اولترا' محـیط MS بـا BAP (۱/۱ میلـی گـرم در لیتـر) و IBA (۰/۰۱ میلی گرم در لیتر) است در حالی که برای دورگه هلو × بادام محیط MS با BAP (۲/۲ میلی گرم در لیتر) و بدون IBA را مناسب دانستند.

قهوه ای شدن برگ ها و آلودگی درون بـافتی در ایـن آزمـایش دو مشـکل جـدی در مرحلـه اسـتقرار و پرآوری به شمار می رفت. در مواردی این مشکل به نوع و ترکیبات آهنی مربوط مـی شـد کـه بـا بررسـی نتـایج آزمایش های سایر پژوهشگران (۲، ۵) و تغییر در نوع و مقدار کـلات آهـن ایـن مشـکل برطـرف شـد. در مـورد اثرهای غلظت و نوع نمک های محیط کشت نیز که باعـث قهـوه ای شـدن بـرگ هـا و آلـودگی هـای درون بـافتی می شوند با تکیه بر نتایج آزمایش های پژوهشگران مختلف (۶، ۹، ۱۵) این نابسامانی فیزیولوژیکی نیز رفع شد.

در این آزمایش آلودگی هـای باکتریـایی نیـز مشـاهده شـد کـه میـزان آلـودگی هـای مربوطـه نسـبت بـه دورگه ها متفاوت بود. برای مثال در دورگـه HS۳۱۴ بیشـترین میـزان و بـرعکس در دورگـه HS۳۰۲ کمتـرین میزان آلودگی دیده شد. همچنین بررسی ها نشان داد که ریـز نمونـه هـای برداشـت شـده در اواخـر زمسـتان از درصد آلودگی های کمتری برخوردار بودند. بنابراین گزینش زمان نمونه گیـری در ایـن نـوع بررسـی هـا بـرای جلوگیری از آلودگی های درون بافتی بسیار مهم می باشد. همچنین بررسی ها نشان داد که نمونه های برداشـته شده در اوایل دوره رشد نیز از درصد آلودگی های کمتری برخـوردار مـی باشـند و ایـن نتـایج بـا نتـایج سـایر پژوهشگران همخوانی دارد (۶، ۱۱).

در مرحله پیش از ریشه زایی و در مرحله طویل شدن برای ایجاد رشد طولی استفاده از جیبرلیک اسید (GA_3) بسیار سودمند است (۱۷،۴) بنابراین در این آزمایش نیز پس از مرحله پرآوری برای ایجاد رشد طـولی به محیط های کشت GA_3 به میزان ۲ میلی گرم در لیتر افزوده شد و همه نژادگان ها به آن واکـنش مثبـت نشـان دادند و نسبت به شاهد (بدون تنظیم کننده رشد) از رشد بسیار خـوبی برخـوردار بودنـد (بـه طـور میـانگین ۵ سانتی متر رشد طولی داشتند) و این برای انتقال به محیط ریشه زایی بسیار مناسب می باشد (۱۱).

با توجه به اینکه دورگه های مورد آزمایش در این مقاله برای اولین بار از نظر توانایی ریزافزایی مـورد ارزیابی قرار می‌گرفتند بنابراین لازم بود روش گندزدایی، محیط کشت و شرایط رشدی مناسب برای هـر یـک از دورگه ها در شرایط کشت درون شیشه ای به طور جداگانه تعیین شود، تا براین اسـاس و سـایر آزمـایش هـای تکمیلی که در این راستا انجام می گیرد بتوان در گزینش و معرفی این دورگه هـا بـه درسـتی قضـاوت نمـود. بـه طوری که با داشتن توانایی ریزافزایی مطلوب می توان از نژادگان های برتر گزینش شده به عنوان پایـه رویشـی در احداث باغ های جدید، یکدست و نوین بادام، زردآلو، هلو، گوجه و آلو استفاده نمود. نتایج این پژوهش نشـان داد که دورگه های HS۳۱۴ وHS۳۰۲ همانند افزایش از راه قلمه از توانایی ریزافزایی بالایی برخوردار هسـتند و با توجه به ویژگی های مطلوبی که این دورگه ها به عنوان پایه از خود نشان داده اند می توان آن هـا را در آینـده نزدیک به صورت انبوه تولید نمود ودر اختیار باغداران قرار داد.

۱- Channuntapipat

Archive of SID

www.SID.ir

منابع REFERENCES

۱- خوشنویس، ب. ۱۳۷۱. بررسی مورفولوژیک و سیتولوژیک هیبرید گوجه × زردآلو. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲- ذوالفقاری نسب، ر. م. خسروشاهی، و. گریگوریان و ع. مطلبی آذر. ۱۳۸۳. بررسی افزایش درون شیشه ای دورگه طبیعی زردآلو× گوجه. مجله علوم و فنون باغبانی ایران ۸۱-۹۲ : ۰۵

۳- رادنیا، ح. ۱۳۷۵. پایه های درختان میوه. نشر آموزش کشاورزی، وابسته به معاونت آموزش و تجهیز نیروی انسانی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. ۴۳۵-۲۴۵ (برگردان).

٤- کمالی، ک. ا. مجیدی و ر. ضرغامی.۱۳۸۰. تعیین مناسبترین محیط کشت و شرایط رشد جهت ریزازدیادی پایه های رویشیGF۶۷۷ (هیبرید هلو × بادام). مجلهٔ نهال و بذر. ۴۷-۳۸ : ۱۷.

۵- میری، س.م، ب. واعظ لیواری، ا. خلیقی و س. ع. قائم مقامی. ۱۳۸۲. کاهش اکسیداسیون فنولی و پرآوری درون شیشه ای شاخساره همگروه های سیب M.9 وM.26. مجله علوم و فنون باغبانی ایران ۱۵۴-۱۴۵ : ۰۴

6- Balla, I. and Vertesy. 2001. *In vitro* culture of Hungarian Apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. Acta Hort. 560:395–398.

7- Beckman, T.G. and G.A. Lang. 2003. Rootstock breeding of stone fruits. Acta. Hort. 622: 23-25.

8- Channuntapipat, Ch., M. Sedgley and G. Collins 2003. Micropropagation of almond cultivars Nonpariel and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstocks Titan × Nemagard. Sci. Hort. 98:473–484.

9- Hatchinsum, F.J. and H.R. Zimmerman, 1987. Tissue culture of temperate fruit and nut trees. In: J. Janick, (ed.). Hort. Rev. 9:37–349.

10- Kester, D.E. 1975. Advances in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette, IN, USA.

11- Kester, D.E. and R.N. Asay. 1986. Hansen 2168 and Hansen 536 two new hybrid rootstocks. HortScience 21:331-332.

12- Kester, D.E., Asay, R.N. and Th.M. Gradzil, 2002. 'Nickels' almond × peach hybrid clonal rootstock. HortScience 137:415–417.

13- Layne, R.E.C., C.H. Bailey, and L. F. Hough 1996. Apricots. In: J. Janick and J. N. Moor, (ed.). Fruit Breeding , Vol. 1., John Wiley and Sons, Inc., New York, USA. 79 –111.

14- Loyd, G. and B. McCown.1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.

15- Murashige T.and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.15 : 473-497.

16- Perez–Tornero, O., J.M. Lopez, J. Egea and L. Burgos. 2000. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Canino. J. Hort. Sci. Biotechnol. 75:283–286.

17- Quoirin M. and P. Lepoivre.1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Hort. 78:437-442.

18- Reeves, D.V., G.A. Couvillon and B.D. Horton. 1985. Effects of giberellic acid (GA_3) on elongation and rooting of 'St. Jolien A' in the *in vitro* condition. Sci. Hort. 26:253–259.

19- Renaud, R., R. Bernhard, Ch. Grasselly, and F. Dosba, 1988. Diploid plum × peach hybrid rootstocks for stone fruit trees. HortScience 23:115–117.

20- Tabachnik, L. and D,E. Kester. 1977. Shoot culture for almond and almond–peach hybrid clones *in vitro*. HortScience 12:545-547.

Archive of SID

www.SID.ir